

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2843675号

(45) 発行日 平成11年(1999) 1 月 6 日

(24) 登録日 平成10年(1998) 10 月 23 日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A

請求項の数49(全 23 頁)

(21) 出願番号	特願平5-516011	(73) 特許権者	999999999
(86) (22) 出願日	平成5年(1993) 3 月 11 日		ダナーファーバー・キャンサー・インス チチュート・インコーポレーテッド アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02115, ボストン, ベニー・ストリート 44
(65) 公表番号	特表平7-500735	(72) 発明者	リャン, ペン
(43) 公表日	平成7年(1995) 1 月 26 日		アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02172, ウォータータウン, ラングド ン・アベニュー 125
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 3 / 0 2 2 4 6	(72) 発明者	バーディー, アーサー・ビー
(87) 国際公開番号	W O 9 3 / 1 8 1 7 6		アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02146, ブルックリン, コッドマン・ロ ード 30
(87) 国際公開日	平成5年(1993) 9 月 16 日	(74) 代理人	弁理士 社本 一夫 (外 5 名)
審査請求日	平成8年(1996) 2 月 20 日		
(31) 優先権主張番号	8 5 0 , 3 4 3	審査官	平田 和男
(32) 優先日	1992年 3 月 11 日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	0 3 3 , 0 8 4		
(32) 優先日	1993年 3 月 11 日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メッセンジャーRNAの同定、単離およびクローニング

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 mRNAのポリアデノシン (ポリ A) テイルの一部分並びに該部分のすぐ上流の非ポリ Aヌクレオチド少なくとも 1 つにハイブリダイズする第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーに mRNA を接触させ、第一プライマーを用いて mRNA を逆転写することにより、mRNA に相補的な第一 DNA 鎖を生成し、第二オリゴデオキシヌクレオチドプライマーが第一 DNA 鎖とハイブリダイズする条件下で、第一 DNA 鎖を第二オリゴデオキシヌクレオチドプライマーと接触させ、第二プライマーを伸長合成することにより、第一 DNA 鎖に相補的な第二 DNA 鎖を生成し、そして第一プライマーおよび第二プライマーを用いて第一 DNA 鎖および第二 DNA 鎖を増幅することにより、DNA をクローニングする

2

工程からなる、核酸サンプル中の、mRNA に相補的な DNA を単離するための非特異的クローニング法。

【請求項 2】 第一プライマーが、ポリ A テイルの一部分並びに該部分のすぐ上流の 2 つの非ポリ Aヌクレオチドにハイブリダイズする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 第一プライマーが、少なくとも 11ヌクレオチドからなるポリ A 相補的領域、およびポリ A 相補的領域のすぐ下流の少なくとも 1ヌクレオチドからなる非ポリ A 相補的領域を含む、請求項 1 記載の方法。

10 【請求項 4】 非ポリ A 相補的領域が少なくとも 2 つの連続したヌクレオチドからなる、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】 mRNA 分子を含む第一核酸サンプルを用意し、

mRNA 分子を含む第二核酸サンプルを用意し、

第一核酸サンプルおよび第二核酸サンプル中の mRNA に存

在するポリアデノシン（ポリA）トラクトの一部分並びにポリA部分のすぐ上流の非ポリAヌクレオチド少なくとも1つにハイブリダイズする第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーに、第一核酸サンプルおよび第二核酸サンプル各々を接触させ、

第一プライマーがハイブリダイズするmRNAを逆転写することにより、第一プライマーがハイブリダイズする第一核酸サンプル中のmRNAに相補的な第一DNA鎖集団、および第一プライマーがハイブリダイズする第二核酸サンプル中のmRNAに相補的な第二DNA鎖集団を生成し、

第一および第二集団中の少なくとも幾つかのDNA鎖に第二オリゴデオキシヌクレオチドプライマーがハイブリダイズする条件下で、第一DNA鎖集団および第二DNA鎖集団を第二プライマーと接触させ、

第二プライマーを伸長合成することにより、第二プライマーがハイブリダイズする第一集団中のDNA鎖に相補的な第三DNA鎖集団、および第二プライマーがハイブリダイズする第二集団中のDNA鎖に相補的な第四DNA鎖集団を生成し、そして

第一プライマーおよび第二プライマーを用いて第一DNA鎖集団および第三DNA鎖集団中のDNA鎖の一部を増幅することにより、第一増幅産物集団を生成し、

第一プライマーおよび第二プライマーを用いて第二DNA鎖集団および第四DNA鎖集団中のDNA鎖の一部を増幅することにより、第二増幅産物集団を生成し、そして

第一増幅産物集団と第二増幅産物集団中の個々の増幅産物の存在またはレベルを比較する

工程からなる、2つ以上の核酸サンプル中の、個々のmRNA分子の存在またはレベルを比較する方法。

【請求項6】第一核酸サンプルが第一細胞中で発現されたmRNAを含み、そして第二核酸サンプルが第二細胞中で発現されたmRNAを含む、請求項5記載の方法。

【請求項7】第一核酸サンプルが第一発生段階の第一細胞中で発現されたmRNAを含み、そして第二核酸サンプルが第二発生段階の第二細胞中で発現されたmRNAを含む、請求項5記載の方法。

【請求項8】第一プライマーが、ポリA部分およびポリA部分のすぐ上流の少なくとも2つのヌクレオチドにハイブリダイズする、請求項5記載の方法。

【請求項9】第一プライマーが、ポリA部分およびポリA部分のすぐ上流の少なくとも1つのヌクレオチドにハイブリダイズする、請求項5記載の方法。

【請求項10】第一プライマーが、少なくとも11ヌクレオチドからなるポリA相補的領域、およびポリA相補的領域のすぐ下流の少なくとも1ヌクレオチドからなる非ポリA相補的領域を含む、請求項5記載の方法。

【請求項11】非ポリA相補的領域が少なくとも2つの連続したヌクレオチドからなる、請求項10記載の方法。

【請求項12】非ポリA相補的領域が3'-NWを含むが、但しVはデオキシアデノシン、デオキシシチジンま

たはデオキシグアノシンである、請求項10または11記載の方法。

【請求項13】第一プライマーが少なくとも13ヌクレオチドからなる、請求項10記載の方法。

【請求項14】第一プライマーが少なくとも6ヌクレオチドからなる、請求項5記載の方法。

【請求項15】第一プライマーが少なくとも9ヌクレオチドからなる、請求項5記載の方法。

【請求項16】第二プライマーのヌクレオチド配列がランダムに選択される、請求項1記載の方法。

【請求項17】第一プライマーまたは第二プライマーのヌクレオチド配列が制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含む、請求項5記載の方法。

【請求項18】第一プライマーおよび第二プライマーの少なくとも1つが複数のオリゴデオキシヌクレオチドからなる、請求項5記載の方法。

【請求項19】複数のオリゴデオキシヌクレオチドが同じヌクレオチド配列を有する複数のオリゴデオキシヌクレオチド分子を含む、請求項18記載の方法。

【請求項20】複数のオリゴデオキシヌクレオチド中の個々のオリゴデオキシヌクレオチド分子が異なるヌクレオチド配列を有する、請求項18記載の方法。

【請求項21】第一オリゴデオキシヌクレオチドが、公知配列のmRNA内に含まれる配列と実質的に同一の配列を含む、請求項5記載の方法。

【請求項22】さらに、第一増幅産物集団中の個々の増幅産物の存在またはレベルと第二増幅産物集団中の違いを検出する工程を含む、請求項5記載の方法。

【請求項23】dNTPsの濃度を約20μM以下にして各々の増幅工程をポリメラーゼチェインリアクションにより実施する、請求項5記載の方法。

【請求項24】dNTPsの濃度を約2μMにして各々の増幅工程をポリメラーゼチェインリアクションにより実施する、請求項5記載の方法。

【請求項25】比較工程において、ゲル電気泳動並びに特定サイズのバンドの存在またはレベルの比較により、第一増幅産物集団および第二増幅産物集団各々を解析する、請求項5記載の方法。

【請求項26】第一細胞が腫瘍形成細胞からなり、そして第二細胞が正常細胞からなる、請求項5記載の方法。

【請求項27】さらに、第一増幅産物集団または第二増幅産物集団からの個々の増幅産物をクローン化する工程を含む、請求項5記載の方法。

【請求項28】ポリアデノシン（ポリA）トラクトの一部分並びに該部分のすぐ上流の非ポリAヌクレオチド少なくとも1つにハイブリダイズする、少なくとも1つの第一オリゴデオキシヌクレオチド、および少なくとも1つの第二オリゴデオキシヌクレオチドを含むキット。

【請求項29】少なくとも1つの第一オリゴデオキシヌ

クレオチドが、ポリA領域の一部分並びに該部分のすぐ上流の少なくとも2つのヌクレオチドにハイブリダイズする、請求項28記載のキット。

【請求項30】少なくとも1つの第一オリゴデオキシヌクレオチドが、ポリA領域の一部分並びに該部分のすぐ上流の1つのヌクレオチドにハイブリダイズする、請求項28記載のキット。

【請求項31】第一オリゴデオキシヌクレオチドが、少なくとも11ヌクレオチドからなるポリA相補的領域、およびポリA相補的領域のすぐ下流の少なくとも1ヌクレオチドからなる非ポリA相補的領域を含む、請求項28記載のキット。

【請求項32】非ポリA相補的領域が少なくとも11の連続チミジンからなる、請求項31記載のキット。

【請求項33】非ポリA相補的領域が少なくとも2つの連続ヌクレオチドからなる、請求項31記載のキット。

【請求項34】非ポリA相補的領域が3'-Nを含むが、但しVはデオキシアデノシン、デオキシチジンまたはデオキシグアノシンのいずれかであり、そして、Nはデオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシチジンまたはデオキシグアノシンのいずれかである、請求項31または32記載のキット。

【請求項35】第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも13ヌクレオチドからなる、請求項31記載のキット。

【請求項36】第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも6ヌクレオチドからなる、請求項28記載のキット。

【請求項37】第一オリゴデオキシヌクレオチドが少なくとも9ヌクレオチドからなる、請求項28記載のキット。

【請求項38】第二オリゴデオキシヌクレオチドのヌクレオチド配列がランダムに選択される、請求項36記載のキット。

【請求項39】第一オリゴデオキシヌクレオチドまたは第二オリゴデオキシヌクレオチドのヌクレオチド配列が、選択された任意の配列を含む、請求項28記載のキット。

【請求項40】第一オリゴデオキシヌクレオチドまたは第二オリゴデオキシヌクレオチドのヌクレオチド配列が、制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含む、請求項28記載のキット。

【請求項41】第一オリゴデオキシヌクレオチドまたは第二オリゴデオキシヌクレオチドが、公知配列のmRNA内に含まれる配列と同一の配列を含む、請求項28記載のキット。

【請求項42】第一オリゴデオキシヌクレオチドまたは第二オリゴデオキシヌクレオチドの少なくとも1つが複数のオリゴデオキシヌクレオチドからなる、請求項28記載のキット。

【請求項43】複数のオリゴデオキシヌクレオチドが同じヌクレオチド配列を有する複数のオリゴデオキシヌクレオチド分子を含む、請求項42記載のキット。

【請求項44】複数のオリゴデオキシヌクレオチド中の個々のオリゴデオキシヌクレオチド分子が異なるヌクレオチド配列を有する、請求項42記載のキット。

【請求項45】第一オリゴデオキシヌクレオチドが、T<sub>11</sub>MG, T<sub>11</sub>MA, T<sub>11</sub>MT, T<sub>11</sub>MC, T<sub>11</sub>MG, T<sub>11</sub>MA, T<sub>11</sub>MT, T<sub>11</sub>MCおよびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項28記載のキット。

【請求項46】第二オリゴデオキシヌクレオチドが、AP-1（配列番号13）、AP-2（配列番号14）、AP-3（配列番号15）、AP-4（配列番号16）、AP-5（配列番号17）およびそれらの混合物からなる群から選択される、請求項28記載のキット。

【請求項47】さらに、逆転写バッファー、リバーストランスクリプターゼ、dNTPs、PCRバッファー、対照RNA、グリコーゲン、水および泳動染料のうちのひとつ以上を含む、請求項28記載のキット。

【請求項48】さらに、細胞からmRNAを単離するための試薬を含む、請求項28記載のキット。

【請求項49】さらに、2以上の核酸サンプル中の個々のmRNA分子の存在またはレベルを比較するための第一オリゴデオキシヌクレオチドおよび第二オリゴデオキシヌクレオチドの使用指示書を含む、請求項28記載のキット。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 発明の背景

本出願は1992年3月11日に出願された係属中の米国出願第07/850,343号の一部係属出願である。

本発明は、個々のmRNAの検出法およびクローニング法に関する。

細胞中の遺伝子の活性はそれらのmRNAおよび蛋白質種の種類および量に反映される。遺伝子発現は、加齢、発育、分化、代謝生産、セルサイクルの進行、および感染疾患または遺伝疾患および他の疾患の状態のような過程において極めて重大である。発現されたmRNAの同定はそれらの分子機構の解明、および上記過程の応用に価値があるであろう。

哺乳動物細胞は約15,000の異なるmRNA配列を含むが、しかしながら、各mRNA配列は細胞内で異なった頻度で存在する。通常、3つのレベルのうちのひとつで発現する。一部の「豊富な」mRNAは細胞あたり約10,000コピー存在し、約3,000〜約4,000の「中間体」mRNAは細胞あたり約300〜500コピー存在し、そして約11,000の「あまり豊富でない」あるいは「稀な」mRNAは細胞あたり約15コピー存在する。中間体および低頻度のmRNAにより象徴される多数の遺伝子が既に確立されたさまざまな技術によりクローン化される（例えば、サムブルック（Sambrook）ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second

d Edition, Cold Spring Harbor Press, pp.8.6-8.35を参照せよ)。

遺伝子の配列または蛋白質についていくらかの知見があれば、いくつかの直接的クローニング法が利用可能である。しかしながら、所望の遺伝子の所在が未知であれば、所望の遺伝子産物を選択または豊富にすることにより、多大な時間および資源を浪費することなく該「未知の」遺伝子を同定することができるにちがいない。

未知の遺伝子の同定は、サブトラクティブハイブリダイゼーション技術または別々のハイブリダイゼーション技術の使用をしばしば含む。サブトラクティブハイブリダイゼーション技術は、極めて密接に関連した細胞集団の使用に頼り、例えば、異なる遺伝子発現が主として所望の遺伝子に関与する場合である。サブトラクティブハイブリダイゼーション技術の鍵を握る要素は包括的な相補的DNA(「cDNA」)ライブラリーの構築である。

相補的DNAライブラリーの構築は現在かなり日常的な工程である。ポリA mRNAを所望の細胞から調製し、そしてRNA依存性DNAポリメラーゼ(「逆転写酵素」)および12~18のチミジンからなるオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いてcDNAの第一鎖を合成する。cDNAの第二鎖は幾つかの方法の一つにより合成するが、最も効果的な方法は、「置換合成」および「プライムド合成」として広く知られている。

置換合成は、RNA:DNAハイブリッド中のRNAのホスホジエステルバックボーンを分断して3'ヒドロキシルおよび5'リン酸を残すリボヌクレアーゼH(「RNAase H」)の使用を含み、mRNA鎖にニックおよびギャップを生じさせ、大腸菌DNAポリメラーゼまたはそのクレノウ断片により用いられる一連のRNAプライマーを作ることによりcDNAの第二鎖を合成する。この反応は極めて効果的であるが、生成されるcDNAがmRNA配列の5'末端を欠いていることがしばしばある。

第二cDNA鎖を生成するためのプライムド合成は、置換合成よりも難しい幾つかの方法の一般名であるが、高い効率で5'末端の配列をクローン化する。通常、cDNA第一鎖の合成後、cDNA鎖の3'末端はターミナルトランスフェラーゼにより伸長合成され、該酵素はデオキシヌクレオチド、最も共通にはデオキシシチジンのホモポリマーテイルを付加する。該テイルは次に、デオキシグアニジルプライマーまたはデオキシグアニジル化されたテイルを有する合成DNA断片にハイブリダイズし、そしてDNA依存性DNAポリメラーゼを用いてcDNA第二鎖が合成される。

プライムド合成法は効果的であるが、該法は労力を要し、生成されるcDNAクローンの全てが、mRNA配列のすぐ上流のデオキシグアニジルトラクト(tract)を有する。該デオキシグアニジルトラクトはインビトロまたはインビボにおいてDNAの転写を阻害し得、そしてサンガーのジデオキシヌクレオチド配列決定法によるクローン

の配列決定を阻害し得る。

cDNAの両鎖が合成されたならば、適切なプラスミドまたはウイルスベクター中に該cDNAをクローン化することによりcDNAライブラリーを構築する。特に、この工程は、平滑末端を生じるように制限酵素により消化されたベクターに、該cDNAの平滑末端を直接連結することにより実施することができる。平滑末端の連結は極めて効率が低いが、これは一般的選択法ではない。通常使用される方法は、制限酵素認識配列を含む合成リンカーまたはアダプターを該cDNAの末端に付加することを含む。次に、該cDNAを高い頻度で所望のベクターにクローン化することができる。

相補的cDNAライブラリーがセルラインから構築されたならば、サブトラクティブハイブリダイゼーションにより所望の遺伝子が同定される(例えば、Sargent T D., 1987, Meth. Enzymol., Vol. 152, pp. 423-432; Leeら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 88, pp. 2825-2830を参照せよ)。サブトラクティブハイブリダイゼーションの一般的方法は、以下のとおりである。cDNAの相補鎖を合成して標識する。この一本鎖cDNAは、ポリA mRNAまたは存在するcDNAライブラリーから作ることができる。該標識cDNAを近縁細胞集団からの過剰量のmRNAとハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション後、ヒドロキシアパタイトカラムのクロマトグラフィーによりcDNA:mRNAハイブリッドを単離する。次に、残りの「引かれた」標識cDNAを用いて、同一細胞集団のcDNAまたはゲノミックDNAをスクリーニングする。

サブトラクティブハイブリダイゼーションは両細胞集団において発現される遺伝子の大多数を除き、そして即ち所望の細胞集団にのみ存在する遺伝子を豊富にする。しかしながら、特定のmRNA配列の発現がわずかな時間のみ、引かれた集団より所望の細胞集団でより豊富になるのならば、引かれたハイブリダイゼーションによる遺伝子の単離は不可能かもしれない。

#### 発明の概要

我々は、少なくとも2種のオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ増幅法により、mRNAをcDNAとして同定、単離およびクローニングする方法を開発してきた。ひとつのアプローチとして、第一のプライマーはmRNAのポリAテイルの最初のAリボヌクレオチドのすぐ上流の配列を含む部位にハイブリダイズすることができる配列を含み、そして第二のプライマーは任意の(arbitrary)配列を含む。他のアプローチにおいて、第一のプライマーはmRNAのポリAシグナル配列を含む部位にハイブリダイズすることができる配列を含み、そして第二のプライマーは任意の配列を含む。他のアプローチにおいて、第一のプライマーは任意の配列を含み、そして第二のプライマーはmRNAのコザック(Kozak)配列を含む部位にハイブリダイズすることができる配列を含む。他のアプローチにおいて、第一のプライマーは既知

の配列を有するmRNAの特定の配列に実質的に相補的な配列を含み、そして第二のプライマーは任意の配列を含む。他のアプローチにおいて、第一のプライマーは任意の配列を含み、そして第二のプライマーは既知の配列を有するmRNAの特定の配列と実質的に同一の配列を含む。第一のプライマーはmRNAの逆転写のためのプライマーとして用いられ、そしてその結果生じるcDNAは第一のプライマーおよび第二のプライマーをプライマーセットとして用いてポリメラーゼにより増幅される。

変更可能な異なるペアのプライマーを用いるこの方法により、極めて微量でしか存在しないmRNAを含む事実上あらゆるまたはすべてのmRNAを、あらゆる細胞種またはあらゆるセルサイクルのステージから同定および単離することができる。さらに、例えば発生の異なるステージまたはセルサイクルの異なるステージにあるかもしれない密接に関連した細胞からのmRNA種の比較から、どのmRNAが構成的に発現され、そして分化により発現されるか、および各々の発現頻度が示され得る。

本明細書にて使用される「第一のプライマー」または「第一のオリゴデオキシヌクレオチド」は、mRNAの逆転写に用いられることによりcDNAの第一鎖を作成し、そして次にcDNAの増幅にも使用されるオリゴデオキシヌクレオチドプライマーであると定義される。第一のプライマーは、このプライマーがmRNAにハイブリダイズし、かつcDNAの第一鎖の3'末端を規定する限りは、3'プライマーとも呼ばれる。本明細書にて使用される「第二のプライマー」は、cDNAの第二鎖を作成し、そして次にcDNAの増幅にも使用されるオリゴデオキシヌクレオチドプライマーであると定義される。第二のプライマーは、このプライマーがcDNAの第一鎖にハイブリダイズし、かつcDNAの第一鎖の5'末端を規定する限りは、5'プライマーとも呼ばれる。

本明細書にて使用されるオリゴデオキシヌクレオチドプライマー「任意の」配列は、個々の判断または裁量に基づくかまたは支配されるものとして定義される。ある例として、任意の配列は完全にランダムかまたはひとつ以上の塩基に関して部分的にランダムでありうる。他の例として、任意の配列は特定の比率のデオキシヌクレオチドを含むように、例えば、ほぼ等しい比率の各デオキシヌクレオチドまたは一つのデオキシヌクレオチドを優勢に含むように選択されるか、または特定の制限酵素認識部位を含まないように選択されうる。任意の配列は、既知のmRNA配列に実質的に等しい（少なくとも50が相同の）配列を含むか、または既知のmRNA配列を含まないように選択されうる。

オリゴデオキシヌクレオチドプライマーは、配列に対して相補的でも、実質的に同一でもありうる。本明細書において定義されるように、相補的オリゴデオキシヌクレオチドプライマーは、mRNAにハイブリダイズする配列を含み、塩基は互いに相補的であり、かつ逆転写酵素が

プライマーを伸長合成してmRNAのcDNA鎖を形成するプライマーである。本明細書において定義されるように、実質的に同一のプライマーはmRNAの配列と同一の配列を含み、50%以上同一なプライマーであり、そして該プライマーはmRNAと同一の配向（orientation）を有し、即ちmRNAとはハイブリダイズしないかまたは相補的でないが、そのようなプライマーを用いてcDNAの第一鎖にハイブリダイズさせることができ、かつ、ポリメラーゼにより伸長合成してcDNAの第二鎖を生成できる。本明細書において定義される、単語「ハイブリダイゼーション」および「ハイブリダイズ」はmRNAまたはcDNA鎖と間のオリゴデオキシヌクレオチドの塩基対として定義される。本明細書において使用される、オリゴデオキシヌクレオチドがmRNAまたはcDNAとハイブリダイズする「条件」は、mRNAまたはcDNAと間のオリゴデオキシヌクレオチドの塩基対が生じ、かつ、ほんのわずかなミスマッチ（ひとつまたはふたつ）の塩基対が許容される温度および緩衝液の条件（以下に記載される）であると定義される。

オリゴヌクレオチドプライマーは既知のmRNAの「コンセンサス配列」であることが知られている配列を含みうる。本明細書において定義されるように、「コンセンサス配列」は、同様の機能および同様の特徴を有する蛋白質の遺伝子ファミリーにおいて見いだされる配列である。コンセンサス配列を含むプライマーの使用は、所望の遺伝子ファミリーの追加のメンバーのクローニングをもたらさる。

本明細書において使用される、オリゴデオキシヌクレオチドプライマーの「好ましい長さ」は、アニーリングの所望の特異性および細胞中の全てのmRNAにハイブリダイズするために必要な所望の特異性を有するオリゴデオキシヌクレオチドの数から決定される。20ヌクレオチドのオリゴデオキシヌクレオチドプライマーは、10ヌクレオチドのオリゴデオキシヌクレオチドプライマーよりも特異的であるが、しかしながら、オリゴデオキシヌクレオチドプライマーへのそれぞれランダムなヌクレオチドの4つほどの付加は、細胞中の各mRNAがハイブリダイズするのに必要なオリゴデオキシヌクレオチドプライマーの数を増加させる。

一つの局面において、一般的に、本発明は、mRNAのポリAテイルの第一のAリボヌクレオチドのすぐ上流の配列を含む部位にハイブリダイズすることができる配列を含む第一のオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いて逆転写するためにmRNAを調製し、そして、上記第一のプライマーと第二オリゴデオキシヌクレオチドプライマー、例えば、任意の配列を有するプライマー、をプライマーセットとして用いるポリメラーゼ増幅法によりcDNAを増幅することにより、mRNAを同定および単離する方法に関する。

好ましい態様において、第一のプライマーはポリAテ

イルのすぐ上流のmRNA配列にハイブリダイズすることができるオリゴデオキシヌクレオチドの3'末端の少なくとも1ヌクレオチドを含み、かつ、ポリAテイルにハイブリダイズする5'末端の少なくとも11ヌクレオチドを含む。完全な3'オリゴデオキシヌクレオチドは少なくとも13ヌクレオチドの長さが好ましく、20ヌクレオチドまでの長さでありうる。

もっとも好ましくは、第一のプライマーはポリAテイルのすぐ上流のmRNA配列にハイブリダイズすることができるオリゴデオキシヌクレオチドの3'の2ヌクレオチドを含む。好ましくは、2つのポリA非相補的ヌクレオチドがVNであるが、その際、Vはデオキシアデニレート(dA)、デオキシグアニレート(dG)、またはデオキシシチジレート(dC)であり、そしてNは、3'末端ヌクレオチドがdA、dG、dCまたはデオキシチミジレート(dT)である。即ち、好ましい第一のプライマーの配列は5'-TTTTTTTTTTNN(配列番号1)である。2ヌクレオチドの使用は、mRNAとそのポリAテイルの間の連結部分(junction)における第一のプライマーの位置どりを正確に提供し、正確なオリゴデオキシヌクレオチドの並びが提供される。mRNAハイブリダイズは不正確に並んだものよりもより安定になり、即ち、正確に並んだ雑種分子(ハイブリッド)が形成され、高い温度においてもハイブリダイズされたままのこる。好ましい態様においては、mRNAサンプルは12のアリコートに分割され、そして第一のプライマーの12の考えうるVN配列のひとつを各反応において使用してmRNAを逆転写を開始する。単一配列のオリゴデオキシヌクレオチドの使用は、mRNAサブセットへの結合、統計的には1/12、即ち、各サンプル中のmRNAの同定を単純化することにより各サンプル中の分析されるmRNAの数を減らす。

幾つかの態様においては、第一のプライマーの3'末端はポリAテイルのすぐ上流のmRNA配列にハイブリダイズすることができる1ヌクレオチドを含むことができ、そして5'末端の12ヌクレオチドはポリAテイルにハイブリダイズすることができる、即ち、該プライマーは5'-TTTTTTTTTTTV(配列番号2)を有するであろう。単一の非ポリA相補デオキシヌクレオチドの使用は、各mRNAの同定に必要なオリゴデオキシヌクレオチドの数を3に減らす、しかしながら、mRNA配列とポリAテイルの連結部分にプライマーをアニーリングさせるための単一ヌクレオチドの使用は、アニーリングの特異性の顕著な損失をもたらす、そして2つの非ポリA相補ヌクレオチドが好ましい。

幾つかの態様においては、第一のプライマーの3'末端はポリAテイルのすぐ上流のmRNA配列にハイブリダイズすることができる3以上のヌクレオチドを含む。3'末端への各ヌクレオチドの付加は正確に並んだ雑種分子の安定性を増加させ、そして、ポリAテイルにハイブリダイズさせるための配列は、添加された各付加的な非

ポリA相補的ヌクレオチドに関する1ヌクレオチドにより低下させることができる。このような第一のプライマーの使用は、与えられたセルラインに含まれるmRNAの迅速なスクリーニングには実用的でなく、ポリAテイルのすぐ上流のmRNAのハイブリダイズする2以上のヌクレオチドと共に第一のプライマーを使用すると各mRNAを同定するのに必要なオリゴデオキシヌクレオチドの数が増加する。例えば、プライマー5'-TTTTTTTTTTNN(配列番号3)は各mRNAに結合するために48の別々の第一プライマーの使用を必要とするはずであり、そして、与えられたセルラインからmRNAをスクリーニングするために必要な反応の数を顕著に増加させる。4つの群として一か所に単一のランダムなヌクレオチドを含むオリゴデオキシヌクレオチドの使用は、各mRNAを同定するために48の別々の反応を設定する必要の問題が解決する。しかしながら、非ポリA相補的配列がより長くなると、各mRNAを同定するのに必要な反応の数を増加させる必要性がすぐに生じる。

好ましい態様において、第二のプライマーは任意の配列を有し、そして9ヌクレオチドの長さである。好ましくは、第二のプライマーは多くて13ヌクレオチドの長さであり、そして20ヌクレオチドの長さでありうる。

他の局面において、一般的には、本発明は、ポリアデニレーションシグナル配列にハイブリダイズすることができる配列および5'または3'に位置する少なくとも4ヌクレオチド、またはポリアデニレーションシグナル配列の両方を含む第一プライマーを用いた逆転写のためにmRNA調製物をプライミングすることによりmRNAを調製および単離するための方法に関し；この完全第一プライマーは少なくとも10ヌクレオチドの長さが好ましく、そして20ヌクレオチドまでの長さでありうる。一つの好ましい態様においては、配列5'-NNTTTATTNN(配列番号4)は、該配列がGCTTTATTNC(配列番号5)であるように選択でき、その結果生じる4つのプライマーはmRNAの逆転写をプライミングするための単一反応において一緒に用いられる。第一のcDNA鎖が逆転写により作成されたならば、次に、第一のプライマーを、例えば任意の配列を含む第二のプライマーと共に用いてcDNAを増幅することができる。

一つの局面においては、一般的には、本発明は、cDNA第一鎖を生成するために第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いて逆転写のためにmRNA調製物をプライミングし、そしてmRNAのコザック配列と実質的に同一の配列を含む第二プライマーを用いてcDNA第二鎖調製物をプライミングすることからなるmRNAの同定および単離法、およびプライマーセットとして第一および第二プライマーを用いてポリメラーゼ増幅法によりcDNAを増幅する方法に関する。

好ましい態様においては、第一および第二のプライマーは少なくとも9ヌクレオチドの長さであり、そしてせ

いぜい13ヌクレオチドの長さであり、そして20ヌクレオチドまでの長さである。最も好ましいのは、第一および第二のプライマーが10ヌクレオチドの長さである。

好ましい態様においては、第一のプライマーの配列は、ランダムに選択されるか、または、第一のプライマーは選択された任意の配列を含むか、または第一のプライマーは制限酵素認識配列を含む。

好ましい態様においては、mRNAのコザック配列と実質的に同一の配列を含む第二のプライマーの配列は、配列NNNANNATGN（配列番号6）を有するか、または配列NNNANNATGG（配列番号7）を有する。Nは4つのデオキシヌクレオチドの任意のひとつである。いくつかの態様においては、第一のプライマーはさらに、プライマーの長さを少なくとも5ヌクレオチド増加させるために、プライマーの5'または3'末端のいずれかに付加された制限酵素認識配列を含む。

他の局面においては、一般的には、本発明は、公知の配列を有する配列を含むmRNAの配列に実質的に相補的な配列を含む第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いた逆転写のためにmRNA調製物をプライミングし、そして、第二プライマーを用いてcDNA第二鎖の調製物をプライミングすることからなる、mRNAの同定法および単離法、およびプライマーセットとして第一および第二プライマーを用いてポリメラーゼ増幅法によりcDNAを増幅する方法に関する。

好ましい態様においては、第一および第二プライマーは少なくとも9ヌクレオチドの長さであり、せいぜい13ヌクレオチドの長さであり、そして20ヌクレオチドまでの長さである。最も好ましくは、第一および第二プライマーは10ヌクレオチドの長さである。

好ましい態様においては、第一プライマーはさらに制限酵素認識配列を含むが、該配列は、該オリゴデオキシヌクレオチドの長さを少なくとも5ヌクレオチド増加させるために、プライマーの好ましい10ヌクレオチドの範囲に含まれるかまたは3'または5'のいずれかに付加される。

好ましい態様においては、第二のプライマーの配列はランダムに選択されるか、または第二のプライマーは選択された任意の配列を含むか、または第二のプライマーは制限酵素認識配列を含む。

他の局面においては、一般的には、本発明は、第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いた逆転写のためにmRNA調製物をプライミングし、そして公知の配列を有するmRNAの配列と実質的に同一の配列を含む第二のプライマーを用いてcDNA第二鎖の調製物をプライミングすることからなる、mRNAの同定法および単離法、およびプライマーセットとして第一および第二プライマーを用いてポリメラーゼ増幅法によりcDNAを増幅する方法に関する。

好ましい態様においては、第一および第二プライマー

は少なくとも9ヌクレオチドの長さであり、せいぜい13ヌクレオチドの長さであり、そして20ヌクレオチドまでの長さである。最も好ましくは、第一および第二プライマーは10ヌクレオチドの長さである。

好ましい態様においては、第一のプライマーの配列はランダムに選択されるか、または第一のプライマーは選択された任意の配列を含むか、または第一のプライマーは制限酵素認識配列を含む。

好ましい態様において、公知の配列を有するmRNAの配列に実質的に相補的な配列を有する第二のプライマーの配列はさらに制限酵素認識配列を含み、該制限酵素認識配列はプライマーの好ましい10ヌクレオチド中に存在していてよく、またはオリゴデオキシヌクレオチドプライマーの長さを少なくとも5ヌクレオチドまで増加させるべくプライマーの3'または5'末端のいずれかに付加されていてよい。

他の局面において、一般的に、本発明は、公知配列を有するmRNAの配列に実質的に相補的な配列を含む第一オリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いた逆転写のためにmRNA調製物をプライミングし、そしてmRNAのコザック配列と実質的に同一の配列を含む第二のプライマーを用いてcDNA第二鎖の調製物をプライミングすることからなる、mRNAの同定法および単離法、およびプライマーセットとして第一および第二プライマーを用いてポリメラーゼ増幅法によりcDNAを増幅する方法に関する。

好ましい態様においては、第一および第二プライマーは少なくとも9ヌクレオチドの長さであり、せいぜい13ヌクレオチドの長さであり、そして20ヌクレオチドまでの長さである。最も好ましくは、第一および第二プライマーは10ヌクレオチドの長さである。

本発明のそれぞれ一般的な局面の幾つかの好ましい態様においては、増幅されたcDNAは単離され、次に所望のcDNAは、ポリメラーゼ増幅反応および第一および第二プライマーを用いて再び増幅される。

本発明のそれぞれ一般的な局面の幾つかの好ましい態様においては、それぞれひとつ以上のプライマーからなる第一および第二オリゴデオキシヌクレオチドプライマーのセットを使用することができる。幾つかの態様において、ひとつ以上の第一プライマーが逆転写反応に含まれ、そして、それぞれひとつ以上の第一および第二プライマーが増幅反応に含まれる。それぞれひとつ以上のプライマーの使用は各反応において同定されるmRNAの数を増加させ、そして使用されるプライマーの総数から、それぞれ個々のcDNAを完全に単離する可能性を残すように、cDNAを単離するための所望の方法に基づいて決定される。好ましい態様において、数百のcDNAが変成ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて単離および同定される。

本発明の方法は、サブトラクティブハイブリダイゼーションを利用する現在のクローニング技術を超えた顕著

な進歩である。一つの局面においては、本発明の方法は、発現頻度を変えられた遺伝子、並びに構成的発現および分化による発現によるmRNAが、簡単な可視的調査による同定および単離を可能にする。他の局面において、本発明の方法は、所望のmRNAをcDNAとして増幅するための特異的オリゴデオキシヌクレオチドを提供し、そして第二cDNA鎖のプライミングのためにcDNA第一鎖にホモポリマーテイルを付加する中間工程が不要になり、それにより、単離遺伝子およびその産物の続く分析においてホモポリマーテイルの干渉が避けられる。他の局面において、本発明の方法は、選択されたmRNAのクローニングおよび配列決定を可能にし、その結果、研究者は、完全鎖長の遺伝子産物に関する相補的cDNAのスクリーニングの前に、遺伝子の相対的必要性を決定するかもしれない。好ましい態様の説明

#### 図面

図1は、本発明の方法を模式的に表す。

図2は、正常マウス線維芽細胞(A31)のN1遺伝子の3'末端の配列である(配列番号9)。

図3は、正常細胞または腫瘍形成性マウス線維芽細胞の全細胞RNA上のN1配列のノーザンプロットである。

図4は、コザックプライマーのみ、AP-1プライマーのみ、コザックプライマーおよびAP-1プライマー、コザックプライマーおよびAP-2プライマー、コザックプライマーおよびAP-3プライマー、コザックプライマーおよびAP-4プライマー、およびコザックプライマーおよびAP-5プライマーを用いた、4つの源(レーン1-4)から調製されたmRNAに関する増幅結果を示す、シーケンシングゲルである。このゲルは以下において完全に記載される。

図5は、mRNAの調製に先立って、非許容温度において培養され、次に許容温度(32.5°C)に24時間シフトしたA1-5セルラインからクローン化されたクローンK<sub>6</sub>の5'末端の部分的配列である。該A1-5セルラインはrasおよび温度感受性変異体P<sup>3</sup>(“P<sup>3</sup>”)で二重形質転換された初期ラット胚線維芽細胞由来である。

#### 一般的な説明、本発明の方法の開発

例示の方法により、本発明の方法の実施例が以下に記載されるが、如何にして特定の例示の実施例が開発されたかを導くことにより記載される。

オリゴデオキシヌクレオチドの長さがmRNAへの特異的ハイブリダイゼーションに適切であることは、本発明の操作に重要である。特異的ハイブリダイゼーションを得るために、慣用的クローニング法またはPCRのいずれかにより、通常は、オリゴデオキシヌクレオチドは20またはそれ以上の長さを選択される。この例における長いオリゴデオキシヌクレオチドの使用は、各試験において同定されるmRNAの数を低下させ、そして各mRNAを同定するために必要なオリゴデオキシヌクレオチドの数を増加させるはずである。最近、PCRによるDNAポリモルフォリズ

ム分析に9-20のヌクレオチドを使用できることが証明された[ウィリアムス(Williams)ら、1991,Nuc.Acids Res.,Vol.18,pp.6531-6535]。

クローン化されたネズミのチミジンキナーゼを含むプラスミド(“TK cDNAプラスミド”)をモデルの鋳型として使用して、mRNAへの特異的ハイブリダイゼーション、および特異的PCR産物の生産のために必要とされるオリゴデオキシヌクレオチドの長さを決定した。mRNA中の内部でハイブリダイズするように選択されたオリゴデオキシヌクレオチドプライマーの長さを6から13ヌクレオチドの間で変化させ、そしてポリAテイルの上流の末端においてハイブリダイズするように選択されたオリゴデオキシヌクレオチドの長さを7から14の間で変化させた。異なるセットおよび異なる長さのプライマーを用いた莫大な試験の後、生成物の特異性に関しては42°Cのアニーリング温度が最適であり、そして内部でハイブリダイズするオリゴデオキシヌクレオチドは少なくとも9ヌクレオチドの長さであり、そして少なくとも13ヌクレオチドの長さのオリゴデオキシヌクレオチドがポリAテイルの上流末端への結合が必要であることが決定された。

今、図1を参照すると、本発明の方法は模式的に表現される。mRNAは第一プライマー、例えばTTTTTTTTTTTVN[配列番号2](T<sub>1</sub>VN)(1)と混合され、そしてcDNA第一鎖を作成するために逆転写(2)される。以下のとおりcDNAを増幅する。cDNA第一鎖を第二のプライマーに添加し、そして適切な濃度のヌクレオチドおよび化合物を含む標準緩衝液中の第一プライマーおよびポリメラーゼを94°Cに加熱してmRNA:cDNA雑種分子を変成し(3)、温度を42°Cに低下させて第二のプライマーをアニールさせ(4)、そして次に温度を72°Cに上げてポリメラーゼによる第二のプライマーの伸長合成を許す(5)。次に、この温度操作を繰り返して(6,7,8)、第一および第二のプライマーによりハイブリダイズされる配列の増幅を開始する。各配列の所望のコピー数が得られるまで、温度操作が繰り返される。

当業界においては明らかとおり、この増幅法は、温度安定性ポリメラーゼまたは温度不安定性ポリメラーゼを用いて実施することができる。温度不安定性ポリメラーゼを用いる場合、プライマーのアニーリング後に、伸長合成工程の始めに、新鮮なポリメラーゼを鋳型に加えなければならない、そして伸長合成工程は選択されたポリメラーゼの許容温度で実施されなければならない。

本発明の方法に関する以下の実施例は、例示の目的のみに示される。認識されたとおり、本発明の方法はあらゆる源からポリAmRNAの単離に使用することができ、そしてあらゆるレベルで、即ちまれなものから豊富なものまで、分化によるかまたは構成的に発現される遺伝子の単離に使用することができる。

#### 実施例1

PCRによる正確な結果および生産性のある結果に必要な

な条件を用いた実験が、TK cDNAプラスミドおよび単一セットのオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いて実施されたが；配列TTTTTTTTTCA（“T<sub>11</sub>CA”）〔配列番号10〕を選択してポリAテイルの上流末端にハイブリダイズさせ、そして配列CTTGATTGCC（“Ltk3”）〔配列番号11〕を選択してポリAテイルの288塩基対（“b p”）上流にハイブリダイズさせた。これら2つのプライマーを用いて期待される断片サイズは299bpである。

PCRは、当業界において公知の標準緩衝液の条件で、10ngのTK cDNAプラスミドを用いて実施された（緩衝液およびポリメラーゼはパーキンスエルマー・シータス社から市販されている）。標準条件は、1 μMの各プライマーの代わりに、2.5 μMのT<sub>11</sub>CA〔配列番号10〕、および0.5 μMのLtk3〔配列番号11〕の濃度でプライマーを用いるように変更された。ヌクレオチド（“dNTPs”）の濃度も、100倍、即ち標準の200 μMから2 μMに変更された。PCRパラメーターは、変成工程が30秒で94°C、アニーリング工程が1分で42°C、そして伸長合成工程が30秒で72°Cであった。dNTPの濃度が200 μMのとき、顕著な量の非特異的PCR産物が観察され、dNTPsの濃度が20 μMまたはそれ以下のときPCR産物が特異的に増幅された。PCR産物の特異性は、増幅DNAの制限酵素消化物により変更され、期待されたサイズの制限断片が生成された。幾つかの例において、第二のプライマーに対して5倍以上の第一プライマーの使用が産物の特異性を増加させたことが見いだされた。2 μMへのdNTP濃度の低下により、PCR産物が高い特異活性で〔α-<sup>32</sup>S〕dATP、0.5 μM〔α-<sup>32</sup>S〕dATP（Sp.Act.1200Ci/mmol）により標識されたが、このことは、高度分析変成ポリアクリルアミドゲル電気泳動、DNA塩基配列決定ゲル、による分析において、PCR産物を区別するのに必要である。

#### 実施例2

次に、短いオリゴデオキシヌクレオチドプライマーを用いたPCR増幅法を使用して、哺乳動物細胞中のmRNAサブセットを検出した。全RNAおよびmRNAは、正常に生育させる「サイクリング（cycling）」、または血清飢餓状態である「静止（quiescent）」のいずれかのマウス線維芽細胞から調製した。RNAおよびmRNAは、T<sub>11</sub>CA〔配列番号10〕をプライマーとして逆転写された。T<sub>11</sub>CA〔配列番号10〕は、mRNAとプライマーを共に65°Cに加熱し、そして該混合物を徐々に35°Cに冷やすことによりmRNAにアニールした。逆転写反応は、モロニーマウスの白血病ウイルスの逆転写酵素を用いて35°Cにおいて実施された。その結果生成されたcDNAは、実施例1に記載されたように、2 μMのdNTPsを用いてT<sub>11</sub>CA〔配列番号10〕およびLtk3〔配列番号11〕の存在下でPCRにより増幅された。T<sub>11</sub>CA〔配列番号10〕プライマーおよびLtk3〔配列番号11〕プライマーの使用は、使用されるTK mRNAを、まれなmRNA転写物の分化による発現に関する内部コントロールにする；TK mRNAは細胞あたり約30コピーで

存在する。DNAシーケンシングゲルにより、さらなる分析において最適な100から500ヌクレオチドの大きさの範囲のmRNAが50から100増幅されたことが明らかとなった。サイクリング細胞または静止細胞において観察されるmRNA種のパターンは、いくつか違うものもあったが、期待されたよりもかなり小さかった。注意すべきことは、G<sub>1</sub>期およびS期において発現されるTK遺伝子mRNAは、期待されたとおり、サイクリング細胞のRNA調製物中でのみ見いだされ、即ち、この方法がTKのようなまれなmRNA種を分離または単離する可能性を証明している。

#### 実施例3

正常または腫瘍形成性マウス線維芽細胞中のmRNAの発現は、PCR増幅により、T<sub>11</sub>CA〔配列番号10〕プライマーおよびLtk3〔配列番号11〕プライマーを用いても比較された。mRNAは、T<sub>11</sub>CA〔配列番号10〕をプライマーとして逆転写され、そしてその結果生成されたcDNAは2 μMのdNTPsおよび上記PCRパラメーターを用いてPCRにより増幅された。PCR産物はDNAシーケンシングゲルにより分離された。TK mRNAは、期待されたとおり、正常および腫瘍形成性mRNA調製物の両方において同じレベルで存在し、まれなmRNA種の代表を例示する目的で良好な内部コントロールを提供した。ひとつの調製物の中には幾つかの他のバンドが存在したが、他の調製物には存在しなく、正常細胞からのmRNAのみにわずかなバンドが存在し、そして腫瘍形成性細胞からのmRNAのみにわずかなバンドが存在し；そして幾つかのバンドは正常細胞および腫瘍形成性細胞中で異なるレベルで発現された。即ち、本発明の方法は、正常に絶え間無く発現される（構成的発現）遺伝子、および分化により発現される遺伝子、抑制される遺伝子、または発現レベルを変える遺伝子を同定するために使用できる。

#### 実施例3において同定されたmRNAのクローニング

3つのcDNA、即ち、TK cDNA、正常細胞中でのみ発現される一つのcDNA（“N1”）、および腫瘍形成性細胞中でのみ発現される一つのcDNA（“T1”）は、電気的溶出、エタノール沈殿により尿素および他の汚染物を除去することによりDNAシーケンシングゲルから回収され、そして2つの連続するPCR増幅をそれぞれ40サイクル、20 μMのdNTPsの存在下で、T<sub>11</sub>CA〔配列番号10〕プライマーおよびLtk3〔配列番号11〕プライマーを用いて、特異性を解決することなく最適の収量を達成するために、PCRにより再び増幅された。再び増幅されたPCR産物は、適切なサイズおよびさらなるコントロールとしてのプライマー依存性を有することが確認され、そして再び増幅されたTK cDNAは2つの異なる制限酵素により消化され、そして消化産物が正確なサイズであることも確認された。

再び増幅されたN1〔配列番号9〕を、TAクローニングシステム（インビトロジェン社）を用いてプラスミドpCR1000中にクローン化し、そして配列を決定した。今、

図2を参照すると、ヌクレオチド配列から、N1断片〔配列番号9〕は、期待されたとおり、下線部Ltk3プライマー15を5'末端に、そして下線部T<sub>1</sub>CAプライマー16を3'末端に連結していることが明らかである。

放射性標識N1プローブを用いた全細胞RNAのノーザン分析により、N1のmRNAは正常マウス線維芽細胞にのみ存在し、そして腫瘍形成性マウス線維芽細胞には存在しないことが再び確認された。今、図3を参照すると、mRNAを検出するために用いられたプローブを該図の右側に記載された部分で標識し、そしてN1のmRNAの大きさは、該図面の左側に記載された28Sおよび18Sマーカーから見積もることができる。N1のmRNAは対数増殖期の正常細胞および静止正常細胞のいずれにおいても低い量で存在し（レーン1および3）、そして対数増殖期の腫瘍形成性細胞および静止腫瘍形成性細胞のいずれにおいても存在しない（レーン2および4）。対照として、放射性標識されたプローブとして3684を用いた同じノーザンブロットを再びブロットし、正常および腫瘍形成性のいずれの細胞においても、等しい量のmRNAを証明するように（レーン1-4）、発現される遺伝子がノーザンブロット上に存在した。

#### 実施例4

3つのセルラインにおけるmRNAの発現の比較を実施したが、そのうちのひとつは、2つの異なる条件で培養した後に試験された。そのセルラインとは、初期胚線維芽セルライン（“REF”）、rasおよびP<sup>3</sup>の変異株（“T101-4”）を用いて二重形質転換されたREFセルライン、およびrasおよびP<sup>3</sup>の温度感受性変異株（“A1-5”）を用いて二重形質転換されたREFセルラインであった。A1-5セルラインは非許容温度である37°Cにおいて培養され、そして37°Cにおいて培養後、mRNAの調製前に許容温度である32.5°Cにおいて24時間シフトした。本発明の方法は、プライマー“コザック”および5つの特定されない配列のプライマー、“AP-1, AP-2, AP-3, AP-4, またはAP-5”のうちのひとつをそれぞれ第二または第一プライマーとして用いて実施された。

“コザック”プライマーの配列は、mRNAの翻訳開始部位のコンセンサス配列に関する公表コンセンサス配列に基づいて選択された（コザック（Kozak）、1991, Jour. Cell Biology, Vol. 115, pp. 887-903）。翻訳開始部位のコンセンサス配列と実質的に同一の配列を有する縮重（degenerate）コザックプライマーを同時に用い、これらの配列は5'-GCCGCCATGG〔配列番号12〕であり、RがdAまたはdGであり、オリゴデオキシヌクレオチドは、プライマーの混合物をもたらす与えられたヌクレオチドの一つのみを有する。

5つの特定されないプライマーの配列は以下のとおりである：AP-1は配列5'-AGCCAGCGAA〔配列番号13〕を有し；AP-2は配列5'-CACCCTGTGT〔配列番号14〕を有し；AP-3は配列5'-ACGTGACCGT〔配列番号15〕

を有し；AP-4は配列5'-GGTACTCCAC〔配列番号16〕を有し；そしてAP-5は配列5'-GTTCCGATCC〔配列番号17〕を有する。これらの任意の配列のプライマーは任意に選択された。

mRNAは第一プライマーとしてAPプライマーを用いて逆転写され、そしてその結果のcDNA第一鎖は両プライマー、APプライマーおよび変更コザックプライマーの存在下で、2 μMのNTPsおよび上記のPCRパラメーターを用いてPCRにより増幅された。PCR産物はDNAシーケンシングゲルにより分離された。少なくとも50-100の増幅cDNAバンドが試験された各セルラインに存在し、そしていくつかのバンドはそれぞれのセルラインにおいて異なったレベルで発現された。対照として、コザックプライマーの不在下で各特定されないプライマーを用いた反応が実施された。特定されないプライマーのみではcDNAは生成されず、即ち、このことは両方のプライマーが、mRNAからcDNAへの増幅に必要であることが証明される。

今、図4を参照すると、各反応に関して使用されたプライマーセットをプライマーと示された線に沿って図の上部に示す。対照として、mRNAの不在下でプライマーを用いた反応、およびコザックプライマーの不在下でmRNAと共にAP-1を用いた反応を実施した。mRNAの不在下では該プライマーによるcDNAの生成はなく、あるいは特定されないプライマーのみでも生成はなかったことから、mRNAが増幅に必要であること、および両方のプライマーはmRNAからcDNAへの増幅に必要であることが証明される。該増幅によるcDNA産物は同じオーダーでゲルに泳動され、即ち、REFセルラインは各レーン1に示され、セルラインT101-4は各レーン2に示され、37°Cにおいて培養されたセルラインA1-5は各レーン3に示され、そして32.5°Cにおいて培養されたセルラインA1-5は各レーン4に示される。プライマーの各対は上記セルラインからの異なったセットのmRNAの増幅をもたらした。コザックプライマーおよびAP-1, AP-2, AP-3, AP-4, またはAP-5をプライマーセットとして用いて実施した反応は、37°Cにおいて培養されたセルラインREF、T101-4、A1-5および32.5°Cにおいて培養されたA1-5のそれぞれにおいて同じcDNAパターンの増幅をもたらした。各セルラインからのmRNAの増幅、およびコザック変更プライマーおよびAP-3プライマーを用いた温度は、A1-5セルラインを32.5°Cにおいて24時間培養した場合に調製された特定のひとつのバンドの発見をもたらしたが、該バンドはあらゆる他のmRNA調製物からは発見されず、該バンドは図4でK<sub>4</sub>として示される。即ち、本発明の方法は、変異株のセルラインにおいて別々に発現される遺伝子を同定するために使用可能である。

#### 実施例4で同定されたmRNAのクローニング

32.5°CにおいてA1-5セルラインを培養した場合にのみ発現したcDNA（“K<sub>4</sub>”）をDNAシーケンシングゲルから回収し、上記のとおりプライマー、コザックおよび

AP-3を用いて再び増幅した。再び増幅された $K_4$ のcDNAは約450bpの適切な大きさを有することが確認され、そしてインビトロジェン社のTAクローニングシステムを用いて使用説明書にしたがってベクターpCRII中にクローン化され、そして配列を決定された。今、図5を参照すると、 $K_4$ クローンはその5'末端に下線部コザックプライマー20、および3'末端に下線部AP-3プライマー21を連結していることが、ヌクレオチド配列から明らかに示される。この部分的cDNAの5'末端は配列番号18であると同定され、そしてこのcDNAの3'末端は配列番号19であると同定される。この部分的配列はオープンリーディングフレームであり、そして遺伝子データベースEMBOおよびGenbankの検索によると、 $K_4$ の3'部分からの翻訳アミノ酸配列がユビキチン連結酵素ファミリー(UBC酵素)と相同であることが明らかとなった。 $K_4$ の3'部分からの該翻訳アミノ酸配列は、*D.melanogaster*(メダノガスター)のUBC酵素と100%同一であり、そしてUBC-4酵素と75%同一であり、そして酵母*S.saccharomyces*(サッカロマイセス)のUBC-5酵素と79%同一であり；そして*Arabidopsis thaliana*(アラビドプシスサリアナ)のUBC酵素と75%同一である。 $K_4$ クローンはこの遺伝子の実際の5'末端を含んでよいが、そうでなければ、コザックプライマーは5'末端の直後でハイブリダイズする。この結果から、本発明の方法を用いて遺伝子の5'コーディング配列をクローン化することができることが証明される。

#### 使用方法

本発明の方法を用いることにより、任意の数の源からmRNAを同定、単離およびクローン化することができる。該方法は、単離後の単一の可視調査により所望のmRNAの同定を提供し、そして研究調査、工業的応用および医療的応用に用いることができる。

例えば、再び増幅されたcDNAは、塩基配列決定することができ、または完全長の遺伝子を得るためにDNAライブラリーをスクリーニングするために使用できる。cDNAの配列が決定されたならば、アミノ酸ペプチドを翻訳蛋白質配列から作ることができ、そして抗体の作成に使用できる。これらの抗体は該遺伝子産物のさらなる調査およびその機能の調査に使用でき、または医療用診断および予後に応用できる。再び増幅されたcDNAはさらなる増殖のために適切なベクター中にクローン化することができ、またはインビトロまたはインビボにおいて発現されるために適切なベクター中にクローン化できる。発現ベクター中にクローン化されたcDNAは蛋白質産物の大量生産のための工業的状況において使用することができる。他の応用としては、再び増幅されたcDNAまたはそれらの対応するクローンは、インサイチュハイブリダイゼーションのプロープとして使用されるであろう。そのようなプロープは疾患の診断および予後にも用いることができる。

#### 他の態様

他の態様は請求の範囲の範囲内である。

オリゴデオキシヌクレオチドの長さは、選択されるアニーリング温度に依存して変更可能である。好ましい態様においては、温度は42°Cに選択され、そしてオリゴヌクレオチドの長さは少なくとも9ヌクレオチドに選択される。アニーリング温度を35°Cに低下したのならば、オリゴヌクレオチドの永さは少なくとも6ヌクレオチドに減らすことができる。

cDNAは $^{32}P$ 以外、例えば $^{33}P$ および $^{35}P$ で標識されたヌクレオチドにより放射性標識することができる。必要であれば、非放射性イメージング法も、本発明の方法に適用することができる。

cDNAの増幅は、上記されたとおり、連続ラウンドの形成、アニーリングおよび伸長合成のための温度循環の間、温度循環ポリメラーゼチェーンリアクションにより、反復コピーのcDNAのための熱安定性DNAポリメラーゼを用いて達成することができる。あるいは、該増幅は、一定温度(isothermal) DNA増幅法(Waikerら、1992, Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.89, pp.392-396)により達成することができる。該一定温度増幅法は適切な制限酵素認識配列を含むことによりcDNAを増幅するための使用に適合させられるはずであり、該配列の一つは一方の鎖がホスホロチオエート化された認識部位でニックが入れられ、その認識部位は $\alpha^{32}P$ 標識dNTPを用いて再生することができる。

同様の機能または同様の機能ドメインを有する蛋白質は、しばしば遺伝子ファミリーのひとつと呼ばれる。多くのこのような蛋白質はクローン化され、そしてファミリーのメンバー間で高度に保存されているコンセンサス配列を含むことが同定されている。配列のこの保存は、ファミリーの新しいメンバー、または関連したメンバーのクローニングのためのオリゴデオキシヌクレオチドプライマーのデザインに使用することができる。本発明の方法を用いれば、細胞由来のmRNAは逆転写することができ、そしてcDNAは、公知のmRNAの配列と実質的に同一の配列を有する少なくともひとつのプライマーを用いて増幅されうる。少なくとも以下のファミリーおよび機能ドメインに関するコンセンサス配列は文献に記載されている：蛋白質チロシンキナーゼ(Hanksら、1991, Methods on Enzymology, Vol.200, pp.533-546)；ホメオボックス遺伝子；ジンクフィンガーDNA結合蛋白質(Millerら、1985, EMBO Jour., Vol.4, pp.1609-1614)；リセプター蛋白質；分泌蛋白質のシグナル配列；核に存在する蛋白質(Guiochon-Mante1ら、1989, Vol.57, pp.1147-1154)；セリンプロテアーゼ；セリンプロテアーゼの阻害剤；サイトカイン；チロシンキナーゼおよび他の蛋白質において記載されているSH2およびSH3ドメイン(Pawsonら、1992, Cell, Vol.71, pp.359-362)；セリン／チロシンおよびチロシンホスファターゼ(Cohen, 1991, M

ethods in Enzymology, Vol. 201, pp. 398-408); サイクリンおよびサイクリン依存性プロテインキナーゼ (CDKs) (例えば、Keyomarsiら、1993, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 90, pp. 1112-1116)。

任意のコンセンサス配列に関するプライマーは、アミノ酸のコドン使用頻度に基づいて容易にデザインすることができる。ひとつまたは複数の部位における縮合 (degeneracy) の利用は所望のコンセンサス配列を含む高いパーセンテージ、即ち 50% 以上、の mRNA にハイブリダイズするプライマーのデザインを可能にする。

本発明の方法において使用するためのプライマーは、ジンクフィンガー DNA 結合蛋白質のコンセンサス配列に基づいて、例えば、蛋白質 PWC のコンセンサス配列に基づいてデザインすることができる。このファミリーのさ

らなるメンバーのクローニングのために有用なプライマーは、以下の配列: 5' -GTAYGCNTGT [配列番号 20] または 5' -GTAYGCNTGC [配列番号 21] を有することができるが、その際、Y は、プライマーがその位置で縮重した場合のデオキシヌクレオチド dT または dC であり、そして N は、イノシン ("I") である。塩基イノシンは他のすべての塩基と対を形成することができ、そしてバリン

"V" がこの位置で高い頻度で縮重した場合のオリゴデオキシヌクレオチドの位置に関して選択された。使用される、記載されたオリゴデオキシヌクレオチドプライマーは、5' -GTATGCITGT と 5' -GTACGCITGT の混合物、または 5' -GTATGCITGC と 5' -GTACGCITGC の混合物である。

## 配列表

配列番号：1

配列の長さ：13

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

TTTTTTTTT TVN

13

配列番号：2

配列の長さ：13

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

TTTTTTTTT TTN

13

配列番号：3

配列の長さ：13

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

TTTTTTTTTT VNN

13

配列番号：4

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

NNTTTATTNN

10

配列番号：5

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GCTTTATTNC

10

29

30

配列番号：6

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

NNNANNATGN

10

配列番号：7

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

NNNANNATGG

10

配列番号：8

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

31  
配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GCCACCATGG

10

配列番号：9

配列の長さ：260

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

CTTGATTGCC TCCTACAGCA GTTGCAGGCA CCTTTAGCTG TACCATGAAG TTCACAGTCC 60  
GGGATTGTGA CCCTAATACT GGAGTTCCAG ATGAAGATGG ATATGATGAT GAATATGTGC 120  
TGGAAGATCT TGAGGTAACCT GTGTCTGATC ATATTCAGAA GATACTAAAA CCTAACTTCG 180  
CTGCTGCCTG GGAAGAGGTG GGAGGAGCAG CTGCCACAGA GCGTCCTCTT CACAGAGGGG 240  
TCCTGGGTGA AAAAAAAAAA 260

配列番号：10

配列の長さ：13

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No<sup>33</sup>

配列

TTTTTTTTT TCA

13

配列番号：11

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GTTGATTGCC

10

配列番号：12

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GCCRCCATGG

10

配列番号：13

配列の長さ：10

35

36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

AGCCAGCGAA

10

配列番号：14

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GACCGCTTGT

10

配列番号：15

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

37

配列

AGGTGACCGT

10

配列番号：16

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GGTACTCCAC

10

配列番号：17

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GTTGCGATCC

10

配列番号：18

配列の長さ：42

配列の型：核酸

39

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GCCGCCATGG CTCTGAAGAG AATCCACAAG GACACCCATG AA

40

42

配列番号：19

配列の長さ：78

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GTTGCATTTA CAACAAGAAT TTATCATCCA AATATTAACA GTAATGGCAG CATTGTCTT 60

GATATTCTAC GGTCACCT 78

配列番号：20

配列の長さ：10

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸・合成DNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

41

42

配列

GTAYGCNTGT

10

配列番号: 2 1

配列の長さ: 1 0

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

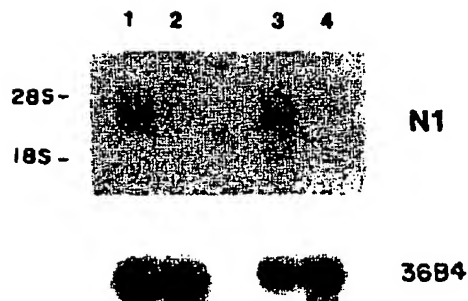
GTAYGCNTGC

10

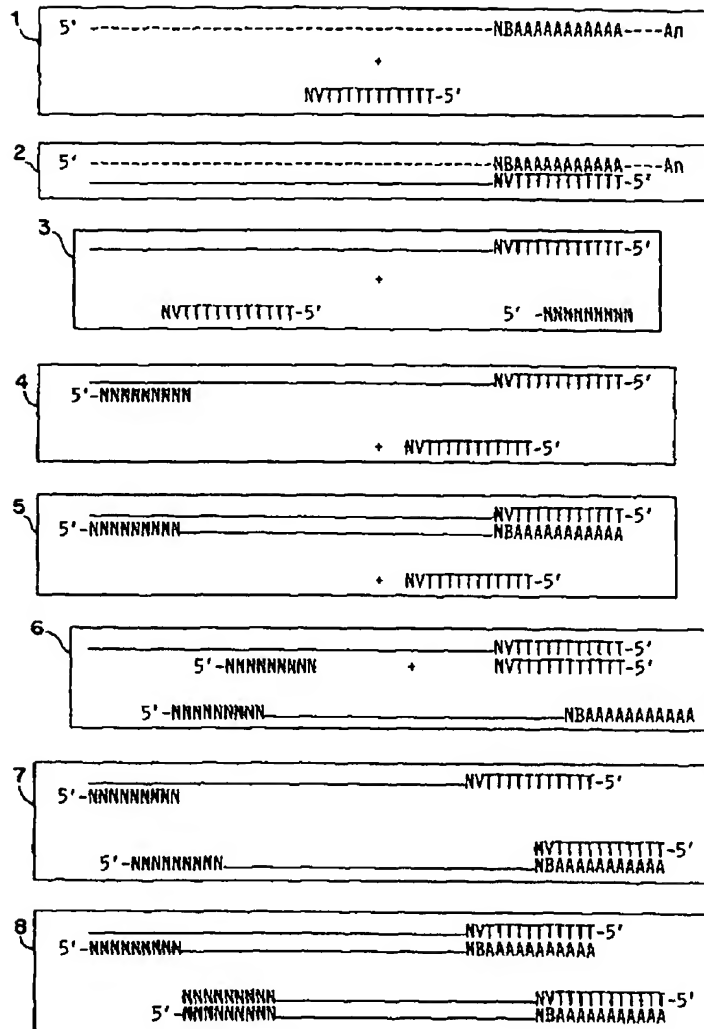
【第2図】

10	20	30	40	50	60
CTTGATTGCC	TCCTACAGCA	GTTCAGGCCA	CCTTTAGCTG	TACCATGAAG	TTCACAGTCC
15	70	80	90	100	110
GGGATTGTGA	CCCTAATACT	GGAGTTCAG	ATGAAGATGG	ATATGATGAT	GAATATGTGC
130	140	150	160	170	180
TGGAAGATCT	TGAGGTAAC	GTGTCTGATC	ATATTCAGAA	GATACTAAAA	CCTAACTTCG
190	200	210	220	230	240
CTGCTGCCTG	GGAAGAGGTG	GGAGGAGCAG	CTGCGACAGA	GCGTCTCTT	CACAGAGGGG
250	260				
TCCTGGGTGA	AAAAAAAAAA				
	16				

【第3図】



【第1図】

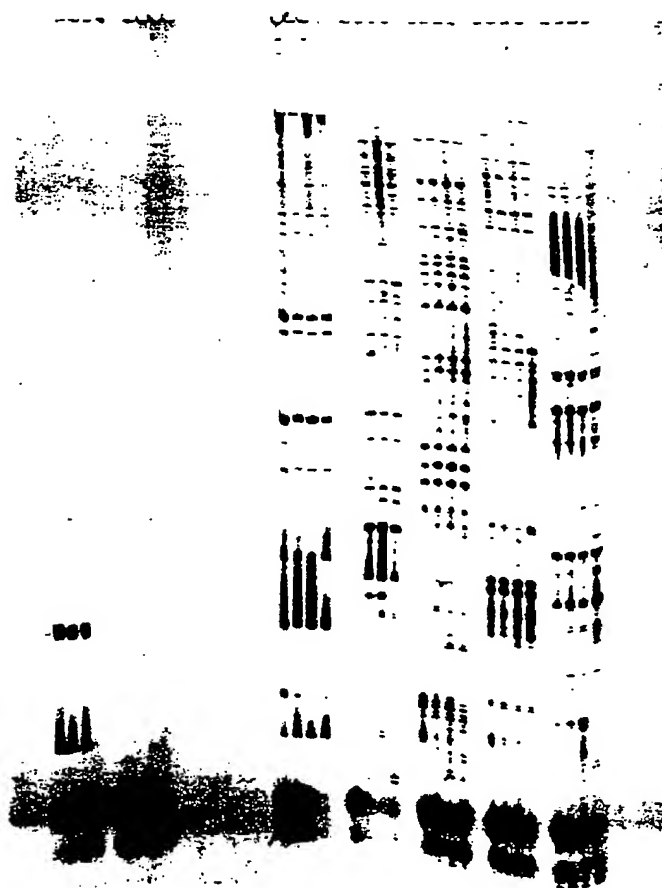


【第5図】

5'-GCCACCATGGCTCTGAAGAGAATCCACAAGGACACCCATGAA.....  
コザック  
.....  
.....  
.....GTTGCATTACACAAGAA  
TTTATCATCCAAATATTAAACAGTAATGGCAGCATTTGCTTGATATTCTACGGTCACCT-3'  
3' TGCCAGTGGG-5'  
AP-3

【第4図】

プライマー	コザック	コザック	コザック	コザック	コザック
	AP-1	AP-1(+コザック)	AP-1	AP-2	AP-3
レーン	1234	1234	1234	1234	1234




---

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>8</sup>, DB名)

C12N 15/00

C12Q 1/68

Biosis Previews